动 物 学 研 究 2009，Aug. 30(4): 396−400 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2009.04396

在体大鼠海马 Schaffer-CA1 条件化双通路与海马组合突触可塑性

曹 栋[1,3]，曹 军[2]，郝 伟[1,*]，徐 林[1,2,*]

（1. 中南大学附属湘雅二医院 精神卫生研究所，湖南 长沙 410011；2. 中国科学院昆明动物研究所，云南 昆明 650223；
3. 南京医科大学附属脑科医院，江苏 南京 210029）

摘要：在戊巴比妥钠麻醉的 Sprague-Dawley 大鼠上，运用海马 Schaffer-CA1 双通路条件化作用（低频配对，600 对脉冲，5Hz，配对刺激相应的兴奋性突触后电位峰值时间间隔为 10ms）在两条 Schaffer-CA1 条件化通路上同时诱导出突触可塑性，呈现出海马组合突触可塑性。结果显示：不管海马 Schaffer-CA1 双通路独立与否，双通路条件化作用均可以同时诱导出长时程增强（long-term potentiation, LTP）和长时程抑制（long-term depression, LTD），呈现出 LTP/LTD 组合突触可塑性。结果表明：海马 Schaffer-CA1 双通路技术，可实现海马突触可塑性的双向诱导，可塑性的方向取决于突触的自身状态。由此提示，与传统的高频诱导 LTP 低频诱导 LTD 相比，在海马 Schaffer-CA1 双通路条件化作用诱导出的组合突触可塑性可以更好地编码海马相关的学习记忆，体现了海马突触可塑性的灵活性与稳定性。

关键词：海马双通路；长时程增强；长时程抑制
中图分类号：Q42；R338 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853-(2009)04-0396-05

Hippocampal Combinatorial Plasticity Induced by Conditioning of Converging Schaffer-CA1 Pathways in Rat *in vivo*

CAO Dong[1,3], CAO Jun[2], HAO Wei[1,*], XU Lin[1,2,*]

(1. *Mental Health Institute, the 2nd Xiangya Hospital of Central South University, Changsha* 410011, *China*;
2. *Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223, *China*;
3. *Affiliated Brain Hospital of Nanjing Medieal University, Nanjing* 210029, *China*)

Abstract: Hippocampal plasticity in two conditioning pathways, i.e. hippocampal combinatorial plasticity, can be induced by conditioning of converging Schaffer-CA1 pathways in Sprague-Dawley rats under pentobarbital sodium anesthesia. During conditioning, paired pulses were delivered at 5Hz（600pairs）and the inter-peak interval of the field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP) of the paired-pulse stimulation was 10ms. Our results showed that long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) might be induced simultaneously by conditioning of two pathways whether two conditioning pathways were independent or not. Thus hippocampal combinatorial plasticity, i.e. LTP/LTD, can be induced successfully. Our results demonstrated that conditioning paradigm could enable the induction of bidirectional hippocampal synaptic plasticity and the direction of synaptic plasticity was determined by the state of synapses. Our results indicate that hippocampal combinatorial plasticity induced by cellular conditioning paradigm may encode hippocampus dependent learning and memory much better compared with LTP and LTD induced by low frequency stimulation or high frequency stimulation independently and may reflect the flexibility and stability of hippocampal synaptic plasticity.

Key words: Hippocampal combinatorial plasticity; Long-term potentiation (LTP); Long-term depression (LTD)

海马是陈述性记忆的关键脑区(Eichenbaum et al, 2007)，活动或经验依赖的海马突触可塑性是海马相关学习与记忆的细胞分子基础(Martin et al, 2000)。海马突触可塑性的经典诱导方式是：高频刺

收稿日期：2009-04-24；接受日期：2009-05-18
基金项目：国家科技支撑计划（十一五）(2007BAI07B01)；国家自然科学基金项目(30530250)
*通讯作者（Corresponding author），E-mail: weihao57@gmail.com; lxu@vip.163.com

激诱导长时程增强 (Bliss & Gardner-Medwin, 1973; Bliss & Lomo, 1973)，低频刺激诱导长时程抑制 (Dudek & Bear, 1992; Lynch et al, 1977)。这种海马突触可塑性的诱导方式往往基于单通路电生理实验，诱导后出现一种方向的突触可塑性变化。然而,在行为学的研究中，行为的学习往往建立在两条输入通路相互作用的基础之上，例如，经典条件反射 (Bailey et al, 2000)。Kandel & Tauc (1965)在海兔的电生理实验中证实，细胞水平的两条通路的相互作用可实现类似行为学的经典条件反射的“学习效应”，即：通过与有活性通路的条件化作用，原先没有活性的通路被激活，实现了突触效能的变化。Dudman et al（2007）、Huang et al（2004）在海马离体脑片上,通过双通路的条件化作用,实现了 LTP 的诱导。最近 Dong et al（2008)在体海马双通路技术（在独立的同侧或双侧海马双通路上，予以 600 对脉冲 5 Hz 低频配对刺激，配对刺激相应的兴奋性突触后电位峰值时间间隔限定在 40 ms 以内）可实现海马突触可塑性的双向诱导。

大鼠在探索新颖环境时可逆转 200 Hz 高频刺激诱导的海马 LTP(Xu et al, 1998a)，随后的实验也证实探索新颖环境时 100 Hz 高频刺激可诱导出大鼠海马 LTP (Li et al, 2003)。急性高台应激可易化海马 LTD (Xu et al, 1997)，然而，当实验大鼠处于吗啡戒断状态时，急性高台应激则易化了海马 LTP(Dong et al, 2006)。由此可见，当实验动物处于不同的生理状态时，同样的事件可诱导出方向相反的海马突触可塑性。因而我们认为海马编码信息时可能会出现双向突触可塑性变化，体现了海马突触可塑性的灵活性与稳定性。基于此，我们进一步探索了在不同独立性条件下，同侧海马双通路条件化作用诱导的海马组合突触可塑性，观察独立或不独立的海马双通路上是否都会出现双向突触可塑性变化。

1　材料和方法

1.1　实验动物

实验动物采用的是雄性 Sprague-Dawley 大鼠（同系繁殖，昆明医学院，动物中心），体重 200－300 g。动物分组饲养于中国科学院昆明动物研究所学习与记忆实验室，予以自由饮水和进食，每天控制 12 h 室内照明，以保持大鼠正常的昼夜节律，环境温度控制在 22—24℃。动物饲养及实验方案均获得中国科学院昆明动物研究所批准。

1.2　仪　器

实验所需仪器包括：手持微型电钻（T60DR, Sae Shin Precision Co., Korea）、大鼠脑立体定位仪（Stoelting, USA）、电生理刺激器（PSIU6G, Grass Instrument Co., W. Warwick, USA）、放大器（Powerlab/4sp, ADIntruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia 和 ETH-255 Bridge/Bio Amplifier, CB Sciences Inc. Dover NH.）、刺激输出及群集兴奋性突触后膜电位即场电位（field excitatory postsynaptic potential，fEPSP）数据采集电脑软件（Scope V3.6.3/s）以及刺激输出及数据采集电脑（Macintosh G4）等。

1.3　电生理实验前的局部手术及电极位置

首先对大鼠实施腹腔注射麻醉（戊巴比妥钠，50mg/kg），无法引出睫反射后，用剪刀去除大鼠头部毛发。皮下注射普鲁卡因实施大鼠头皮局部麻醉，用手术刀纵向切开头皮，暴露并清洁颅骨表面。随后将动物移至立体定位仪并固定动物头部，低流量持续鼻导管供氧（含 95% O_2和 5% CO_2）。以大鼠脑立体定位图谱海马坐标为参考，标记刺激电极、记录电极和参考电极在颅骨表面的位置，以微型电钻在标记点钻出 4 个直径约 1.5mm的电极插入孔，深度达软脑膜表面。首先将一个直径 1.5mm的不锈钢螺钉作为参考地线置入颅腔（前囟前 7mm，中缝左旁 1mm），深度以触及软脑膜为准，避免过分压迫脑组织。记录电极和刺激电极是两股拧在一起的Teflon绝缘的铂铱合金丝电极（90%铂 和 10%铱，内径 50 μm，外径 75 μm）（World Precision Instruments, Sarasota, FL）。记录电极位置大约位于前囟后 3.5－4.0 mm，中缝右旁 2.5－3.0 mm；刺激电极 1 位于前囟后 4.2－4.8mm，中缝右旁 3.5－3.8 mm；刺激电极 2 位于前囟后 3.5－4.0mm，中缝右旁 3.5－3.8mm (Dong et al, 2008; Xu et al, 1997; Xu et al, 1998a，b)。整个实验过程中，动物俯卧于电热毯上，体温控制在（37±0.5）℃（肛表）。为维持实验所需的大鼠麻醉深度，动物腹腔留置导管，以便于必要时补充戊巴比妥钠。实验结束后探查大鼠海马，以核对电极位置。

1.4　记录兴奋性突触后膜电位

在位于海马 Schaffer 侧枝的刺激电极上，施加波宽 0.1ms 的刺激方波,位于海马 CA1 辐射层的记录电极就可以记录到 fEPSP。调整刺激强度直至相

应的 fEPSP 幅值约为最大值的 50%，并记录与此刺激强度相对应的 fEPSP 为基础突触传递的 fEPSP。两条通路的独立性判断：以 40 ms 时间间隔给出一次配对刺激，如果配对刺激后的 fEPSP 幅值与单独刺激时 fEPSP 幅值变化在±10%以内，就认为这两条通路独立(Dong et al, 2008; Xu et al, 1997; Xu et al, 1998a, b)。记录 40 min 基础突触传递的 fEPSP（每 30 秒记录一次 fEPSP，两条通路轮流记录）作为 fEPSP 基线值。诱导方案：配对刺激（600 对, 5 Hz）分别作用于两通路，即：条件通路 1（conditioning pathway 1, CP1）和条件通路 2（conditioning pathway 2, CP2），两通路的 fEPSP 的峰值时间间隔为 10 ms（配对刺激的时间间隔根据 fEPSP 的峰值潜伏期矫正）。诱导结束后再记录 60 min fEPSP（每 30 秒记录一次 fEPSP，两条通路轮流记录），并以最后 5 min 的 fEPSP 幅值均值与诱导前记录的基线 fEPSP 幅值均值相比较（百分比值）来判定 LTP 或 LTD 的幅度。

1.5 数据统计分析

所有的实验结果导入Origin 7.0 做图。计量资料比较采用t检验统计处理，计数资料比较采用χ^2检验，所有数据导入SPSS11.0 进行统计分析（P<0.05，表示统计学上有显著差异）。

2 结 果

2.1 海马 Schaffer-CA1 双通路条件化作用诱导出 LTP/LTD 可塑性组合

我们发现海马 Schaffer-CA1 双通路条件化作用（配对刺激：600 对，5 Hz），可诱导出 LTP/LTD 组合可塑性（图 1），即在条件通路 1 诱导出 LTP，与此同时，在条件通路 2 诱导出 LTD。

2.2 海马 Schaffer-CA1 双通路是否独立不影响 LTP/LTD 可塑性组合的诱导

共有 7 只大鼠经过Schaffer-CA1 双通路条件化作用诱导出LTP/LTD海马组合可塑性。符合独立性检测要求（n=4）与不符合独立性检测要求（n=3）的海马Schaffer-CA1 双通路都出现了LTP/LTD可塑性组合，而且χ^2检验显示两种可塑性组合形式的构成比，无显著差异（χ^2=0.143, P=0.705）。提示不管通路间是否有相互重叠或独立，这种组合可塑性可能广泛存在于多种生理状态。

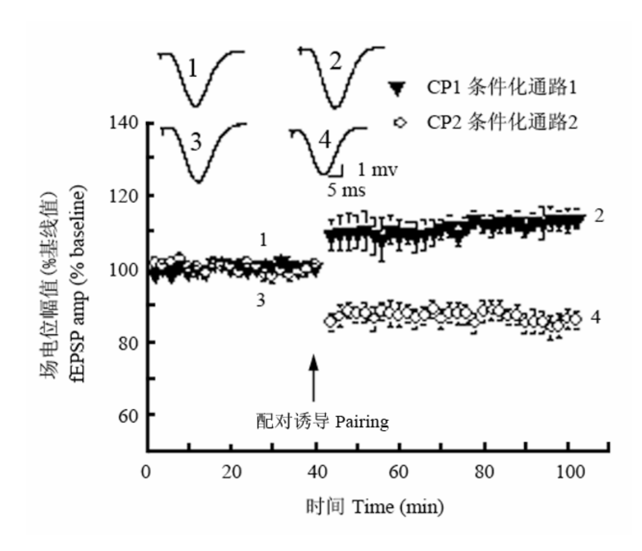


图 1 Schaffer-CA1 双通路条件化作用诱导出 LTP/LTD 可塑性组合

Fig. 1 Conditioning of converging Schaffer-CA1 pathways induced LTP/LTD hippocampal combinatorial synaptic plasticity

Schaffer-CA1 双通路条件化作用诱导出 LTP/LTD 组合（n=7, 条件化通路 1:（112.9±3.3）%, P<0.001,与基线相比; 条件化通路 2:（85.0±2.8）%， P<0.001,与基线相比.）。插图是 fEPSP 的示意图，其中 1 和 2 表示 LTP， 3 和 4 表示 LTD。水平刻度：5ms, 垂直刻度：1mv。

Conditioning of converging Schaffer-CA1 pathways induced LTP/LTD combinatorial synaptic plasticity (n=7, CP1: (112.9±3.3)%, P<0.001, vs. baseline; CP2: (85.0±2.8）%, P<0.001, vs. baseline.). Insets: representative traces of the field EPSP (average of six consecutive sweeps) at the times indicated by the numbers in Fig. 1. Trace 1 and 2 represented LTP. Trace 3 and 4 represented LTD. Calibration bars: horizontal = 5ms, vertical = 1mv.

3 讨论

最近有报道在乌拉坦麻醉下，独立的 Schaffer-CA1 双通路在 40 ms 时间窗内，经过条件化作用（低频配对，600 对脉冲，5 Hz）可诱导出 LTP/LTD 海马组合突触可塑性，并认为这种突触可塑性是输入时序依赖的可塑性（timing of afferent pathways dependent plasticity, TADP）(Dong et al, 2008)。我们的结果显示在戊巴比妥钠麻醉下，独立或不独立的 Schaffer-CA1 双通路在 10ms 时间窗内，经过条件化作用（低频配对，600 对脉冲，5 Hz）均可诱导出 LTP/LTD 海马组合突触可塑性，从而表明了细胞水平的条件化作用诱导出的组合突触可塑性可在多种生理条件下出现。既往曾有报道同突触 LTP 伴有异突触 LTD(Lynch et al, 1977; Royer & Pare, 2003; Scanziani et al, 1996)，或同突触 LTD 伴有异突触 LTP(Royer & Pare, 2003)，但是上述异突触可塑性，没有经历诱导过程。我们发现的

LTP/LTD 的组合可塑性是在共同参与诱导、互为条件刺激的双通路中产生的，因而按照突触可塑性与记忆理论(Martin et al, 2000)，可能 LTP 与 LTD 都参与了信息编码的过程。

3.1 细胞水平的条件化作用与行为学的条件化作用

传统 LTP 或 LTD 的诱导大多基于单通路技术(Dudek & Bear, 1992; Malenka, 1991; Malenka & Nicoll, 1993)，然而，行为的学习如经典条件反射都是基于双通路输入的相互作用(Bailey et al, 2000)。所以我们在体海马双通路技术的诱导方式可以近似地认为是一种细胞水平的条件化作用，因而这种方式诱导出的海马组合突触可塑性可能更好地编码了海马相关的行为学条件化作用。我们的结果显示双通路的条件化作用可同时诱导出 LTP 和 LTD，提示我们海马组合突触可塑性可能以突触效能及可塑性组合两种形式来实现信息编码，推测信息加工可能是各种形式 LTD 与 LTP 的组合过程，类似于数字 0，1 进行组合编码。这种组合编码似乎更加合理，因为它有助于提高记忆编码效率及记忆容量。

3.2 海马组合突触可塑性与突触可塑性的稳定性与灵活性

基于 Hebb 假说的突触可塑性，如 LTP、LTD 具有不稳定性(Abbott & Nelson, 2000)，具有使突触效能无限增强或无限降低的倾向，这种正反馈特性可导致突触可塑性饱和并失去输入特异性或使突触效能降至 0。Turrigiano 等首先在大脑皮层培养细胞上报道了“Synaptic scaling”（即神经活动会引起相反的代偿反应，从而使得神经元的平均发放率保持相对稳定），从此引入了神经活动稳定性的新概念：神经元的平均活性就像其他生理变化一样，都受到经典内稳态负反馈（homeostatic feedback）的调控，通过调定点（set-point）的设定，恢复平衡与稳定，减少突触效能无限增强或无限降低的可能性(Turrigiano et al, 1998; Turrigiano & Nelson, 2004)。但是，信息传递往往在数毫秒到数分钟内既已完成，而上述负反馈调节往往需要数分钟到数小时的时间 (Davis, 2006)。然而，双通路条件化作用，可同时诱导出 LTP 或 LTD，就很好地避免了单通路一种方向可塑性变化可能带来的不稳定性。另一方面突触权重由于自身衰减（decay）或局部新内容的更新或者由于新的学习形成全新的突触权重，那便需要有灵活性（flexibility）(Abraham & Robins, 2005)。双通路技术可实现海马突触可塑性的双向调节，这样 LTP 或 LTD 往往取决于突触的自身状态，因而有助于突触权重的精确调节，更好地体现了灵活性。因此，基于海马双通路条件化作用的海马组合突触可塑性可以更好地编码了海马依赖的学习与记忆，更好的地体现海马突触可塑性的灵活性与稳定性。

参考文献：

Abbott LF, Nelson SB. 2000. Synaptic plasticity: Taming the beast[J]. *Nat Neurosci*, **3** Suppl: 1178-1183.

Abraham WC, Robins A. 2005. Memory retention：The synaptic stability versus plasticity dilemma[J]. *Trends Neurosci*, **28**(2): 73-78.

Bailey CH, Giustetto M, Huang YY, Hawkins RD, Kandel ER. 2000. Is heterosynaptic modulation essential for stabilizing Hebbian plasticity and memory[J]? *Nat Rev Neurosci*, **1**(1): 11-20.

Bliss TV, Gardner-Medwin AR. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaestetized rabbit following stimulation of the perforant path[J]. *J Physiol*, **232**(2): 357-374.

Bliss TV, Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path[J]. *J Physiol*, **232**(2): 331-356.

Davis GW. 2006. Homeostatic control of neural activity: From phenomenology to molecular design[J]. *Annu Rev Neurosci*, **29**: 307-323.

Dong ZF, Han HL, Cao J, Zhang X, Xu L. 2008. Coincident activity of converging pathways enables simultaneous long-term potentiation and long-term depression in hippocampal CA1 network *in vivo*[J]. *PLoS ONE*, **3**(8): e2848.

Dong ZF, Zhong WH, Tian M, Han HL, Cao J, Xu TL, Luo JH, Xu L. 2006. Stress evoked by opiate withdrawal facilitates hippocampal LTP *in vivo*[J]. *Hippocampus*, **16**(12): 1017-1025.

Dudek SM, Bear MF. 1992. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**(10): 4363-4367.

Dudman JT, Tsay D, Siegelbaum SA. 2007. A role for synaptic inputs at distal dendrites: Instructive signals for hippocampal long-term plasticity[J]. *Neuron*, **56**(5): 866-879.

Eichenbaum H, Yonelinas AP, Ranganath C. 2007. The medial temporal lobe and recognition memory[J]. *Annu Rev Neurosci*, **30**: 123-152.

Huang YY, Pittenger C, Kandel ER. 2004. A form of long-lasting, learning-related synaptic plasticity in the hippocampus induced by heterosynaptic low-frequency pairing[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**(3): 859-864.

Kandel ER, Tauc L. 1965. Heterosynaptic facilitation in neurones of the abdominal ganglion of *Aplysia depilans*[J]. *J Physiol*, **181**(1):1-27.

Li S, Cullen WK, Anwyl R, Rowan MJ. 2003. Dopamine-dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty[J]. *Nat Neurosci*, **6**(5): 526-531.

Lynch GS, Dunwiddie T, Gribkoff V. 1977. Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation[J]. *Nature*, **266**(5604): 737-739.

Malenka RC. 1991. Postsynaptic factors control the duration of synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus[J]. *Neuron*, **6**(1): 53-60.

Malenka RC, Nicoll RA. 1993. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms[J]. *Trends Neurosci*, **16**(12): 521-527.

Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis[J]. *Annu Rev Neurosci*, **23**: 649-711.

Royer S, Pare D. 2003. Conservation of total synaptic weight through balanced synaptic depression and potentiation[J]. *Nature*, **422**(6931): 518-522.

Scanziani M, Malenka RC, Nicoll RA. 1996. Role of intercellular interactions in heterosynaptic long-term depression[J]. *Nature*, **380**(6573): 446-450.

Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, Nelson SB. 1998. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons[J]. *Nature*, **391**(6670): 892-896.

Turrigiano GG, Nelson SB. 2004. Homeostatic plasticity in the developing nervous system[J]. *Nat Rev Neurosci*, **5**(2): 97-107.

Xu L, Anwyl R, Rowan MJ. 1997. Behavioural stress facilitates the induction of long-term depression in the hippocampus[J]. *Nature*, **387**(6632): 497-500.

Xu L, Anwyl R, Rowan MJ. 1998a. Spatial exploration induces a persistent reversal of long-term potentiation in rat hippocampus[J]. *Nature*, **394**(6696): 891-894.

Xu L, Holscher C, Anwyl R, Rowan MJ. 1998b. Glucocorticoid receptor and protein/RNA synthesis-dependent mechanisms underlie the control of synaptic plasticity by stress[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**(6): 3204-3208.